

公開特許公報

昭53—24033

⑤Int. Cl ² .	識別記号	⑤日本分類	庁内整理番号	④公開	昭和53年(1978)3月6日
A 61 K 39/00	A B C	30 G 0	7432—44		
A 61 K 39/36	A B C	30 D 0	6667—44	発明の数	2
G 01 N 31/22	1 0 3	30 A 0	6617—44	審査請求	未請求
G 01 N 33/16		30 H 211	5727—44		
		30 D 3	6667—44		
		113 E 6	6904—49		
		113 A 22	6807—49		

(全 15 頁)

④アレルギー含有物質およびその製法

①特 願 昭52—98629

②出 願 昭52(1977)8月16日

優先権主張 ③1976年8月17日③イギリス国

①34114/1976

③1977年6月9日③イギリス国

①34114/1976

⑦発 明 者 ウエン・イエク・リー

カナダ国マニトバ州ウイニペツ

⑦発 明 者 アレック・セホン

カナダ国マニトバ州ウイニペツ

グ・アカデミーロード694番

⑧出 願 人 フアーマシア・アクチエボラー
グ

スエーデン国(エス—75104)

ウプサラ1ピー・オー・ボツク

ス181番

⑧代 理 人 弁理士 山下白

明 細 書

1. 発明の名称 アレルギー含有物質およびその
製法

2. 特許請求の範囲

1) アレルギー分子と非免疫原性水溶性重合体との共有結合結合体であり、そしてその結合度とその結合体を免疫寛容性かつ実質的に非アレルギー性および非免疫原性とするようなものであることを特徴とする、問題のアレルギーに關係するレアギン抗体産生の免疫学的に特異的な抑制剤として使用するためのアレルギー含有物質。

2) 重合体が約2,000～約35,000の分子量を有するポリエチレングリコールである、前記第1項記載のアレルギー含有物質。

3) 重合体がポリビニルアルコール、ポリビニルピロリドン、ポリアクリルアミドおよびア

ミノ酸ホモ重合体よりなる群から選ばれる、前記第1項記載のアレルギー含有物質。

4) 問題のアレルギーに關するレアギン抗体の産生の免疫学的に特異的な抑制剤として使用するアレルギー含有物質を製造するにあたり、非免疫原性水溶性重合体を得られる結合体を免疫寛容性でありかつ実質的に非アレルギー性および非免疫原性とする程度にアレルギー分子に共有結合的に結合させることを特徴とする、アレルギー含有物質の製造方法。

5) 重合体が約2,000～約35,000の分子量を有するポリエチレングリコールである前記第4項記載の方法。

6) 重合体がポリビニルアルコール、ポリビニルピロリドン、ポリアクリルアミドおよびアミノ酸のホモ重合体より成る群から選ばれる前記第4項記載の方法。

- 7) 人を含む哺乳類において薬理学的に許容しうる方法で前記哺乳類に治療的有效薬量で注射することによる問題のアレルゲンに関するレアギン抗体産生の免疫学的に特異的な抑制剤としての前記第1項定義のアレルゲン含有物質の使用。
- 8) 重合体が約2,000～約35,000の分子量を有するポリエチレングリコールである前記第7項記載の使用。
- 9) 重合体がポリビニルアルコール、ポリビニルピロリドン、ポリアクリルアミドおよびアミノ酸のホモ重合体より成る群から選ばれる前記第7項記載の使用。

異つて、これら物質中に存在する抗原(アレルゲン性)成分に対してレアギン抗体を産生する。

一般的に、抗原なる語は、免疫反応を引き出さしめる物質を意味しており、そして通常これはまた、抗原-抗体相互作用を示すために使用しうる多くのインビトロ(試験管内)およびインビボ(生体内)の免疫学的方法の一つによつて相当する抗体の検出のために使用される物質でもある。同様に、アレルゲンなる語はレアギン抗体を誘発させそしてこれと結合する能力を有する抗原を意味して使用されている。しかしこの定義は、アレルゲンがIgE以外のクラスの抗体をも誘発せしめるという可能性を除外するものではない。本明細書に使用されている場合、抗原性なる語はインビトロで相当する抗体と結合しうる抗原またはアレルゲンの能力として定義されている。アレルゲン性または皮膚活性は、

3. 発明の詳細な説明

本発明は、問題のアレルゲンに関するレアギン抗体産生の免疫学的に特異的な抑制剤として使用するための新規なアレルゲン含有物質に関する。本発明はまた、そのような新規なアレルゲン含有物質の製造法にも関する。

本発明はまた、人を含む哺乳類におけるIgEクラスのレアギン抗体により仲介された「即発性タイプ」の一般的アレルギーの免疫学的特異的抑制のための非免疫原性水溶性重合体(例えばポリエチレングリコール)とのアレルゲンの免疫寛容性結合体の使用にも関する。

開発国の人口の約15%は、その環境中の一見無害な物質例えば吸入物(例えば喘息および枯草熱の原因となる花粉、ほこりおよび羽毛)、種々の食品、羊毛、薬物その他のアレルギーを患っている。アレルギー患者は、正常な人とは

アレルゲンがインビボで同族レアギン抗体と結合しそれにより全身性アナフィラキシーまたは局所皮膚反応を直接皮膚テストまたは受動的皮内アナフィラキシー(PCA)反応のどちらかで誘発せしめる能力として定義される。そして限定された意味における免疫原性なる語は相当する特異的抗体反応をインビボで誘発させる抗原またはアレルゲンの能力として定義される。免疫寛容性なる語は、特異的様式でインビボで相当する未変性の初めのアレルゲンに対する免疫反応を実質的に抑制するアレルゲン含有物質の能力を意味している。この意味においては、免疫寛容性なる語は免疫抑制と相互交換的に使用されている。

レアギン抗体はこれら抗体を誘発に産生する個体かまたはアレルゲン性血清を注入された個体の組織のマスト細胞および好塩基細胞に固定

される免疫グロブリン全群の中で顕著な性質を有している。

適当なアレルゲンによりこれら細胞中に固定された IgE 抗体分子の交叉結合はこれら細胞の顆粒減少を誘発させる。これに次いでそれらの顆粒からの薬理学的血管活性剤例えばヒスタミン、ブラディキニン、アナフィラキシー遅延作用物質(SRS-A)、好エオジン細胞性アナフィラキシー化学走性(chemotactic)ファクター(BCF-A)および血小板活性化ファクターの遊離が起る。これら化合物は血管および平滑筋組織に作用することによつてアレルギー症状すなわち全身性または局所的炎症反応を生ずる。重症の場合にはこれら反応はアナフィラキシーを招来する。

現在使用されている治療法は多年にわたる有害アレルゲンの時間のかかる一連の注射を包含しておりそしてこれは天然生成物の固有のアレ

ルゲン性の故にそしてそれによるそれらの全身的アナフィラキシー反応誘発の危険性の故に、少量で投与されなくてはならない。

従つて、安全かつ有効な治療法のためには、完全に阻止しないにしても、顕著に免疫学的に特異的な様式で IgE 抗体反応を抑制することによつて免疫寛容性として作用しうべき天然アレルゲンの誘導体を製造することが肝要である。更にこれら免疫寛容性誘導体は二つのその他の性質すなわち(i)それらは非アレルゲン性であるべきでありすなわちそれらはインビボでマスト細胞および好塩基細胞に固定されている IgE 抗体と結合しえないものでありそして従つてアナフィラキシー反応を誘発させえないものであるべきであるということ、および(ii)それらは非免疫原性であることすなわちそれらは反復注射によつてそれら自身に免疫反応を誘発せしめうる

べきではないことを満足せねばならない。

ここに、非免疫原性の水溶性重合体を共有結合的にこれらアレルゲンに結合させて免疫原性アレルゲン〔例えば卵アルブミン(OA)およびブタクサ花粉の水溶性抽出液の非透析性成分および犬アルブミン〕を実質的に非免疫原性(アジュバントなしで投与した場合)でありかつ非アレルゲン性である免疫寛容性誘導体に変換することによつてこれら目的を達成しうることが発見された。

従つて、本発明は問題のアレルゲンに関するレアギン抗体の産生の免疫学的に特異的な抑制剤として使用するためのアレルゲン含有物質を包含する。そして前記物質は非免疫原性水溶性重合体とのアレルゲン分子の共有結合結合物であるということ、そしてその結合度がそのような結合体を実質的に非アレルゲン性および非免

疫原性であると同時に免疫寛容性とするようなものであることを特徴としている。

本発明はまた得られる結合物が実質的に非アレルゲン性かつ非免疫原性であると同時に免疫寛容性となるような程度に非免疫原性水溶性重合体をアレルゲン分子に共有結合的に結合せしめるそのようなアレルゲン含有物質の製造法をも包含している。

本発明は更に、前記^{ルゲン}アレ^レに感受性の動物(人を含む)における問題のアレルゲンに関するレアギン抗体の形成の抑制にあたつて前記定義のアレルゲン含有物質を治療的有效投与量で薬学的に許容しうる様式で前記動物に注射することによるアレルゲン含有物質の使用を包含している。

前記アレルゲン含有物質の製造に使用されるべき非免疫原性水溶性重合体としてポリエチレ

ングリコール特に約2,000～3,5000の分子量を有するものが非常に有用であると証明された。この意味におけるポリエチレングリコールはまた生理学的に許容しうるその誘導体例えばモノ低級アルキルエーテル好ましくはモノメチルエーテルをも包含しているが、この場合分子末端水酸基が共有的にカップリングに因して使用されている。

また、その他の非免疫原性水溶性重合体例えばポリビニルアルコール、ポリビニルピロリドン、ポリアクリルアミドおよびアミノ酸ホモ重合体も使用しうる。

そのような重合体のアレルゲン分子への共有カップリングに対しては、生物学的活性物質と不活性重合体との間のカップリングに対して一般に使用されているすべてのカップリング方法を使用することができる。そのような方法は例

えば混合無水物、シアヌル酸クロリド、イソチオシアネートによるカップリング、SH誘導体と CH_2I 誘導体との間の反応である。しかしながら所望のカップリングを生ずるその他の方法を考究することは当業者には極めて容易であろう。

カップリング反応はアレルゲン分子および重合体分子中の活性基の間でなされる。必要な場合にはそのような基をカップリング反応の前に前記分子中に導入しなくてはならない。かかる活性基は例えば $-\text{NH}_2$ 、 $-\text{NCS}$ 、 $-\text{SH}$ 、 $-\text{OH}$ 、 $-\text{CH}_2\text{I}$ および $-\text{COOH}$ である。そして分子中にすでに存在していない場合には、それらを周知の方法で導入することができる。アレルゲンへの重合体のカップリングは前記のように得られた物質が免疫寛容性(免疫抑制的)でありかつ実質的に非アレルゲン性かつ非免疫原性であるような程度まで実施される。この結果を与えるアレルゲ

ン分子に対する重合体分子の結合度はアレルゲンに応じて変化しうる。しかしながら当業者にはそれぞれの場合に異つた程度の一連の結合度の結合体(コンジュゲート)を製造しそして前記要求が満足される特定の範囲を確立することによつて、どのようにして必要な結合物が得られるかということとは明らかである。低すぎる結合度はアレルゲン性および免疫原性のある結合物を与えそして高すぎる結合度は免疫寛容性でない結合物を与える。

本発明によれば原則的に人および哺乳類におけるアレルギーの一般の形態の原因のすべてのアレルゲンに対して免疫寛容性誘導体を製造することが適当である。そのようなアレルゲンは例えば動物(特に家畜例えば犬、猫、牛、馬その他)、種々の草木の花粉、昆虫毒素、食品、家屋のほこり、だにおよびかびから導かれる。

本発明のアレルゲン含有物質は好ましくは食塩水または生理学的に許容しうるバッファーの溶液の形で使用される。そのような溶液は非経腸的に投与することができ、そして好ましくはそれらは静脈内または筋肉内に投与される。投与は適当な間隔で反復することができる。

アレルゲン含有物質は凍結乾燥状態で保存することができる。

本発明を実施例および表ならびに添付図面を参照して説明するが、ここで第1図および第2図は本発明の手段により得られる試験結果のダイアグラムを示すものである。試験のための材料および方法は次のとおりである。

動物

同系交配の8～12週令($\text{C}_{57}\text{BL}/6 \times \text{DBA}/2$) F_1 マウス($\text{B}_6\text{D}_2\text{F}_1$ と命名)および交雑交配のラット(hooded rat)がノース・アメリカン・ラボラ

トリーズ・サブライ・コンパニーから購入された。

ハプテン-蛋白結合物の製造

卵アルブミン(OA) および牛γ-グロブリン(BGG)〔それぞれニュートリショナル・バイオケミカル・カンパニー(米国オハイオ州クリーブランド在)およびカルバイオケム(米国カリフォルニア州サンディエゴ在)から購入〕を0.2 M Na_2CO_3 溶液中での2,4-ジニトロベンゼンスルホン酸ナトリウム(DNBS)との反応によるDNP₃-OAおよびDNP₁₈-BGG結合物の合成に使用した。ASC 1 mg当り 6.5×10^{-8} MDNPを含有するアスカリス・ズームの2,4-ジニトロフェニル化された抽出物(DNP-ASC)は、全部で5.5 mlの蒸留水中で、4.6 mgの Na_2CO_3 の存在下に、4.6 mgのASCを2.4 mgのDNBSと37℃で2時間反応させることにより製造された。未反応ハプテンはセ

バイオケミカル・コーポレーション(米国ニュージャージー州フリーホールド在)から購入された。マウスはまた抗DNPおよび抗AscIgE抗体誘発のために0.5 mlのPBS中で1 mgの $\text{Al}(\text{OH})_3$ と予備混合したDNP-Asc 10 μgによつてもまた感作させた。5匹のマウス群を同一の方法で処置しそして各群内のマウス血清を受動的皮膚アナフィラキシー(PCA)アッセーにより平均レアギン力価を測定するためにブールした。満足の終点は直径5 mmの反応を与える各血清の最高希釈の逆数とした。異つたラットにおいて測定された同一レアギン血清のPCA力価は、2のファクター内で再現性であつた。すべてのPCA力価は2回の測定の平均として報告されている。免疫マウスの血清中のレアギン以外の免疫グロブリンクラスの抗体の共存は、受動的血球凝集(HA)アッセーにより確立された。

フアデックス(登録商標)0-25(エビクロロヒドリリンで交叉結合されたデキストラン、フルマシア・フアイン・ケミカルズ社製)のカラムを通してのゲル濾過により除去された。

免疫および免疫反応測定

至適抗DNPおよび抗OA IgE反応のためにはマウス腹腔内に、0.5 mlの磷酸バッファ-含有食塩水(PBS)中に新たに調整した水酸化アルミニウム1 mgと共に懸濁された1 μgの標準低投与量のDNP₃-OAを注射した。腹腔内経路で投与した場合のこの薬量を本明細書では以後感作薬量と呼称する。

ブタクサ(RAG)花粉アレルゲンに特定のな至適IgE反応は、マウスにおいては、1 mgの $\text{Al}(\text{OH})_3$ の存在下に10 μgのRAGまたはRAGの粘製成分の一つを表わすAgEを腹腔内に注射することにより誘発される。AgEはワージントン・

分析の感度はこの研究に対しては充分であると考えられた。その理由はそれが対照として標準兎抗DNP血清を使用して各HA試験に対して1,000の程度のHA力価を与えたからである。

チエスタービーティ系ラットにおいて至適抗DNPおよび抗OA反応を誘発させるためには、これら動物に1 mgの新しく調製した $\text{Al}(\text{OH})_3$ および 10^{10} 個のボルデテラペルトウシスワクテン(コンノートラボラトリーズ社製品)を懸濁させた0.5 mlのPBS中の1 μgのDNP₃-OAを腹腔内注射した。マウスおよびラットで産生されたIgE抗体の力価を雑交配ラットにおける受動的皮膚アナフィラキシー(PCA)アッセーにより測定した。

アドプティブ細胞移植

この方法は感作しそして免疫寛容化したマウスから脾細胞をX線照射(550 R)同種遺伝子

保持受容体に移植しそして受容体に細胞移植4時間後に $Al(OH)_3$ の存在下に標準感作薬量の抗原を注射することよりなる。

例 1～2

6,000および20,000の平均分子量を有するポリエチレングリコール(本明細書中では以後においてPEG₆およびPEG₂₀と呼ぶ)(ペーカ・ケミカル・コンパニー製品)の2バッチを、シアヌル酸をカップリング剤として使用してシャロン氏等の方法[J. Immunol. 114, 1585(1975)参照]と同様にしてOAおよびRAGにカップリングさせた。

OA-PEG₆およびOA-PEG₂₀結合体は次のようにして製造された。

6 mlの0.5 N NaOHに溶解させたどちらかのPEG(0.4 g)を5 mlのPBS中の0.1 gのOAと混合し、そしてシアヌル酸クロリドの溶液(3 ml

のN,N'-ジメチルホルムアミド中0.2 g)を一定の撈拌を行ないつつこの混合物に滴下添加した。室温で2時間そして4℃で更に24時間の間撈拌しつつ反応を進行せしめた。この反応混合物を次いで、PBSに対して透析してすべての未反応シアヌル酸クロリドを除去し、そして減圧下に5～7 ml体積まで濃縮させた。この結合体を次いでファルマシア・ファイン・ケミカルズ社のセフアロース(登録商標)4 Bカラムを通して溶出剤としての副酸バッファ-含有食塩水(BBS)を使用して過することによつて遊離PEGおよびOAから単離した。OA-PEG結合体は主としてカラムの空孔容積に相当する分画中に存在していた。これら分画を集めそして濃縮した。

RAG-PEG₆およびRAG-PEG₂₀の製造法はOA-PEG結合体に対して記載したものと同様であつた。すなわち、その反応混合物は2 mlの0.5 N NaOH

中0.1 gのPEG₆またはPEG₂₀、50 ml PBS中40 μgのRAGおよび1 mlのN,N'-ジメチルホルムアミド中80 μgのシアヌル酸クロリドよりなつていた。RAG-PEG結合体もまた前記のようにセフアロース4 Bカラムを通しての過によつて単離された。

次に生物学的実験について述べる。

1. DNP-OA系

(A) OA-PEG結合体とのレアギン抗体反応の抑制

レアギン抗体産生に及ぼすOA-PEG₆結合体の効果を試験するために、1 μgのOA-PEG₆をマウスに静脈内注射し、その4時間後にそれらを第0日に $Al(OH)_3$ 中の1 μgのDNP₅-OAの標準感作薬量で免疫した。マウスには、それ以上の結合体の投与を与えることなしに、第28日に免疫抗原の腹腔内第2回注射を与えた。対照マウス群には結合体の代りにPBSが与えられた。ハプ

テンおよびキャリアに対して特異的なレアギン抗体反応は第1図に説明されている。第1図中で縦軸上のPCA力価は横軸上の週で表わした時間に対してプロットされている。上方の二本の曲線は対照群に関するものでありそして下方の二本の曲線は試験群を表わすものである。実線で描れた曲線は抗DNPを示し、また一点鎖線の曲線は抗OAを表わす。

第1図からみられるように、対照群はハプテンおよびキャリア両方に対する最高の一次IgE反応(レスポンス)が感作後14日目に示され、そして顕著に強化された二次抗DNPおよび抗OA IgE反応は一次免疫後4週間目に投与された感作薬量のDNP-OAの第2次注射後7日に誘発される。他方、第0日にOA-PEG₆の単一注射で処理されたマウスはDNPおよびOA両者に対する一次IgE反応の完全抑制を生じた。そしてこれら

マウスの二次免疫は対照動物に対して記録されたものの約10%に相当する低いIgE反応のみを誘発させた。従つて、OA-PEG₆によるマウス処理がDNP-OA反応に包含されたOA特異性Tヘルパー細胞の長期間抑制を生ずることが明白である。

観察されたOA-PEG₆の抑制効果が免疫学的に特異的であるかどうかを検査するために、感作薬量のDNP-OAを与える4時間前に1mg PEG₆をマウスに静脈内注射した。他のマウス群には、PEG₂₀をPEG₆の代りに置きかえた。通常のように対照マウスには感作薬量のDNP-OAのみを与えた。すべてのマウスに第20日に第二感作薬量のDNP-OAが与えられた。表Iに記載の結果から、遊離PEG₆またはPEG₂₀はどちらも動物のレアギン抗体反応生成能力に影響しないことが明らかであり、そして従つてOA-PEG₆により誘発され

た抑制は、PEG₆にカップリングされた抗原に実際に特異的であると結論することができる。

(B) OA-PEG₆による免疫抑制の特異性

IgE抗体の観察された抑制反応の特異性を更に例証するためにマウスに第0日目にAL(OH)₃中の1μgのDNP-OAまたは10μgのDNP-Ascを腹腔内投与する4時間前に、0.8mgのOA-PEG₆の静脈内注射をした。第28日にこれら動物にAL(OH)₃中の同一抗原の第二次腹腔内注射をなした。OA-PEG₆を与えられなかつた二つの対照マウス群をこの実験に加えた。すなわち一つの群には第0日および28日にDNP-OAの二つの感作薬量を与えそして他の一群には同一日にAL(OH)₃中の10μgのDNP-Ascの二薬量を与えられた。

表IIに要約されている知見は、OA-PEG₆の静脈内投与によるDNPおよびOA両方に対するIgE

反応の抑制の特異性に対して更に支持を与えるものである。すなわち、OA-PEG₆で処理したマウス(試験A)はDNP-OAで感作された場合、DNPまたはOAのどちらに対しても一次IgE反応を示さず、そしてそのDNP-OAに対する二次反応は対照動物のものより顕著に低かつた。他方、OA-PEG₆結合体によるマウス処理は、無関係の抗原DNP-Ascに対してIgE抗体反応を示すそれらの能力には影響しなかつた。すなわち、対照Bおよび試験B各群のマウスの動物血清のIgE抗DNPおよび抗Asc抗体力価に有意の差はなかつた。

(C) OA-PEG結合体のレアギン抗体反応進行阻止能力

本実験は、抑制前少くとも5週間前に確立せしめた進行性レアギン抗体反応をOA-PEG結合体の投与により阻止する可能性を調べるためのも

のである。注射のスケジュールおよび血清のPCA力価は表IIIに示されている。これらのデータは、DNPおよびOAに対する長時間持続性でしかも増強されたIgE反応は第40日および第68日に第二次および第三次感作薬量を与えられた対照マウス群においては、82日以上にわたつて保持されうるけれども、第37日、第38日および第39日に感作マウスに3回1日当り0.8mgのOA-PEG₆を静脈内注射投与することとは第二次および第三次注射後のこれら動物の抗DNPおよび抗OA IgE反応を発現する能力を非常に顕著に低下させる結果となつたことを示している。

OA-PEG₂₀がDNP-OAに対するレアギン抗体反応継続を阻止しうるであろうことを証明するために、第0日にDNP-OAで感作したマウスに第22日に1mgのOA-PEG₂₀の注射を与え、そして第

28日に感作薬量のDNP-OAのブースター腹腔内注射を与えた。対照マウス群には、第0日および第28日にDNP-OAの二つの感作注射のみを与えた。表Ⅳから明らかなように、OA-PEG₂₀による感作マウスの処理はDNPおよびOA両者に対する非常に顕著なレアギン抗体反応抑制を生じた。

OA-PEG₆またはOA-PEG₂₀どちらかの投与後2日以内(すなわち第24日)のマウスの抗OA IgE力価は、対照動物血清中のレアギン抗体の水準に比べて影響はなかつたことを強調すべきである。このことは、PEGとの結合によるOAの改質が未改質OAの決定因子の隠蔽または根本的変化を生じたことを示している。その理由は、そうでないならば、24日前に感作させた動物の血清中に存在しつづけるレアギン抗体はOA-PEG結合体の比較的大量の薬量の注射によつて中和されてしまつてゐる筈だからである。事

細胞移植のために殺すことになつてゐる、無処理感作マウスにOA-PEG₆を注射した後5日以内にはわずかに抑制されているだけであつた。しかしながら、アドプティブ移植後、OA-PEG₆で処理した試験マウスの脾細胞はX線照射された受容体に投与された追加のDNP-OAの感作薬量に対して対照群のマウス脾細胞に比べて非常に劣つた程度にしか反応しなかつた。従つて、感作マウスのOA-PEG₆処理はアドプティブ移植後抗原の追加感作薬量に再露出させた場合のこれら動物の脾細胞のレアギン反応発現能力を阻止する結果となるということを結論することができる。

(四) OA-PEG結合体による血球凝集抗体の抑制

レアギン抗体産生に及ぼすOA-PEG結合体の抑制効果の他に、これらの結合体の血球凝集抗体産生に及ぼす効果が研究された。この目的のため

実この解釈は以下に報告する実験において正しいことが証明された。

(D) アドプティブ移植における非反応性の保持

脾細胞のすべてのドナーを、屠殺45日前に感作薬量のDNP-OAで免疫した。それらの脾臓除去の9日前に、これら動物を3群にわけ、そして各群には0.5 ml PBS中0.2 mgのOA-PEG₆の静脈内薬量、0.5 ml PBS中0.8 mgのOA-PEG₆、または0.5 ml PBSのみを与えた。すべての動物を次いで殺しそして3群の各々の 5×10^7 個の脾細胞懸濁液を受容体たる同一遺伝子を有するX線照射(550R)マウスに移植した。細胞移植4時間以内に、すべての受容体にDNP-OAの感作薬量を腹腔内投与した。そしてそれらの抗DNPおよび抗OA IgE抗体力価を2週間にわたつて追跡した。

表Ⅴから明らかなようにレアギン抗体水準は

めに、マウスに感作薬量のDNP-OA投与の4時間前に、0.2 mgまたは1.0 mgのOA-PEG₆またはOA-PEG₂₀の静脈内注射を与えた。そしてすべてのマウスに28日後に第二の感作薬量の注射を与えた。表Ⅵに記載した結果により示されるように、2種のOA-PEG生成物のどちらも0.2 mg薬量では血球凝集力価には有意の効果をもたせてゐなかつた。しかしながら、0.8 mgのより高い薬量におけるOA-PEG調製物の投与は低いしかし有意の血球凝集抗体抑制を招来した。そしてこの効果は抗OA血球凝集抗体よりも抗DNPに対してより顕著であつた。これらの知見からOA-PEG結合体はIgMおよび/またはIgG抗体産生におけるよりもIgE抗体の産生に關与する細胞に対して一層顕著な抑制効果を有していると推定できる。

Ⅱ. ブタクサアレルギー系

(F) RAG に対するレアギン抗体反応の阻止

RAG に対するレアギン抗体の至適産生は、
B₆D₂F₁マウスにおいては、0.5 ml PBS に 1 mg
AL(OH)₃ と共に 1.0 μg の RAG を懸濁させたもの
を投与することによつて誘発されることが示さ
れた。従つて、以後に記載される実験において
は、ブタクサアレルギーに対するレアギン抗体
誘発のための標準感作薬量は 0.5 ml の PBS 中の
AL(OH)₃ 1 mg と混合した 1.0 μg の RAG よりなつ
ていた。RAG のレアギン反応継続を阻止する試
みにおいては、感作されたマウスに第 15 日に
0.8 mg の RAG-PEG₆ または RAG-PEG₂₀ を与えた。
その試験結果は第 2 図に表わされているが、そ
の縦軸の抗 RAG PCA 力価は横軸上に週で表わし
た時間に対してプロットされている。実線の曲
線は対照群を表わし、そして破線の曲線は
RAG-PEG₂₀ 群をそして破一点鎖線の曲線は

RAG-PEG₆ 群を表わしている。第 2 図からわかる
ように、これら 2 種の RAG-PEG 結合体のどちら
かによる処理は抗 RAG IgE 抗体の低下を生じそ
してこの IgE 抗体の水準は第 21 日に RAG の第
二感作薬量の投与にもかかわらず減少しつづけ
る。対照的に、対照動物は典型的二次反応を発
現する。

抗 RAG レアギン反応に及ぼす RAG-PEG 結合体
の抑制効果の特異性は、表 VII に概記した実験に
おいて示された。すなわち、第 33 日に静脈内
経路で OA-PEG₆ または RAG または PBS を与えた
マウスに一次免疫後第 34 日に第 2 の RAG 感作
薬量を投与することは IgE 反応を強化する結果
とはならなかつた（すなわち、抗 RAG PCA 力価
は 500 の程度であつた）が、しかし前日に
RAG-PEG₆ を与えられた動物に第 34 日に第二感
作薬量を投与することは顕著な抗 RAG レアギン

力価の低下を生じた（すなわち抗 RAG PCA 力価
は 60 に減少）。更に、第 33 日に AL(OH)₃ な
しに未結合の RAG 調製物 500 μg を投与するこ
とは第 41 日に検出した二次反応を妨害しなかつ
たという事実（これは第 34 日の RAG 第二感
作薬量により動物を再注射したことの結果であ
る）は、前記に観察された抗 RAG IgE 抗体水準
の低下が注射された結合物による IgE 抗体の中
和によるものではなくて、特定の抗 RAG IgE
反応抑制にいたる動物の免疫系の緩和（モジュ
レーション）によるものであることを示してい
る。また、第 28 日（すなわち、免疫動物に対
して抗体の第二感作薬量を投与した日と同日）
における 800 μg の RAG の静脈内投与は、第 35
日の第二の抗 RAG PCA 力価を約 20 まで低下さ
せる結果となつたこともまた注目すべきである。
これは循環 IgE 抗体の中和に由来するものであ
りうる。しかしながら、これらの動物でさえも免
疫学的な抑制の徴候は全くみせなかつた。その

第 56 日に第三

理由は、感作薬量の RAG で更に免疫すると、通
常の既往性 IgE 反応を生ずるからである。

(G) OA-PEG および RAG-PEG 結合体の PCA 反応発
現不能

OA-PEG 結合体のアレルギー性を、PCA アッセ
ー法を使用してラットで試験した。この目的の
ためには、DNP-OA の単一感作薬量で腹腔内免疫
することにより生成された既知の PCA 力価（す
なわち 1400）の標準マウスレアギン血清 0.1
ml を迅速に 2 倍希釈し、そしてこれら希釈溶液
の 50 μl 容量を雑交配ラットの剃毛した皮膚に
皮下注射した。皮膚感作の 24 時間後に、異つ
た量の未変性 OA または OA-PEG₆ または OA-PEG₂₀
および 0.5 % エバンスブルー染料含有溶液 1.0
ml を異つたラットに静脈内注射した。30 分後
にラットを殺しそして PCA 反応を判定した。

表 VIII からわかるように、1 mg の未変性 OA は、

強い PCA 反応を呈し、そして OA への分子量 6000 または 20,000 のどちらかの未結合 PEG の添加は OA に由来する PCA 反応を阻害しなかつた。それに対照的に OA-PEG₆ および OA-PEG₂₀ は共に OA よりもはるかに一層多量で注射された場合(すなわちそれぞれ 10 mg および 6 mg)でさえも有意の反応を引き出し得なかつた。更に、実験 8 および 9 は、OA-PEG₆ または OA-PEG₂₀ のどちらかで試験された場合に PCA 反応を全く示さなかつた動物がこれら結合物の一次チャレンジから 20 分後に 1 mg の未変性 OA を再注射した場合に良好な反応を与えたことを示している。これらの結果は、OA-PEG 結合物がインビボでは抗 OA-IgE 抗体を結合しおおよび中和しえなかつたことを示す。この解釈に照らして、実験 5 で観察された 10 mg 量量の OA-PEG₆ による最小 PCA 反応(60 の程度の力価)はチャレンジに使用さ

れた OA-PEG₆ 調製物中の非常に少量の未変性 OA の存在または OA 1 分子当りに非常に少量の PEG 分子を含有しそして従つてまだ若干の接近可能な抗原決定因子を有しているようなある種の OA-PEG 結合物の存在に由来すると考えることができる。これらすべての結果に基づいて、OA の PEG 結合物は PCA 反応を誘発させえないかまたは感作皮膚部位に結合している抗 OA-レアギン抗体を中和しえないということは、最初の OA の抗原決定因子が接近不可能であるかまたは OA-PEG 結合物中で根本的に変化されているという事実に由来すると結論することができる。

RAG-PEG₂₀ の PCA 反応誘発能力は、ラット皮膚感作に対してネズミ科の抗 RAG-レアギン血清を使用して前記のようにして試験された。感作皮膚部位のチャレンジに対しては、RAG または RAG-PEG₂₀ のどちらかの溶液(エバンスブル

-染料の存在下に)をラットに静脈内注射した。これら PCA 試験の結果は、表Ⅱに要約されている。このことから、未変性 RAG アレルゲンは強い PCA 反応を引き出すが、RAG-PEG₂₀ はいかなる PCA 反応をも引き出さないと結論することができる。更に、この表に示した最後の実験の結果は、RAG-PEG₂₀ の投与がその 20 分後に未変性 RAG を動物に再注射した場合の PCA 反応引き出しを阻害しなかつたということも示している。従つて、RAG-PEG₂₀ 結合物は未変性 RAG アレルゲンが所有している容易に近接可能な抗原決定因子を有していないということ、そして従つて抗 RAG IgE 抗体でコーティングされたマスト細胞を誘発させえないということが推定しうる。

(H) OA 感作ラットにおける OA-PEG 結合物のアナフィラキシー誘発不能

以下に記載の実験は、OA-PEG 結合物がインビ

ボでは抗 OA IgE 抗体と結合しえないという別の証明を与えるものである。マウスはヒスタミンに対して抵抗性なので相当する抗原に対する IgE 抗体を有しているマウスへの感作抗原注射は容易にはアナフィラキシーを誘発しない。従つて、OA-PEG 結合物がインビボでマスト細胞結合抗 OA IgE 抗体と結合しそしてアナフィラキシー反応を誘発させうるかどうかの試験に対してアナフィラキシーを生じやすいラットが選ばれた。この目的のためには、チエスタービーティ系ラットを前記 ONP-OA で免疫することによつて全身的に感作させた。全身反応に対しては、1 ml の PBS 中 2 mg の未変性 OA または OA-PEG₆ または OA-PEG₂₀ を出血の 6 時間後に各感作動物に静脈内投与しそしてこれら化合物のすべての効果を注意して観察した。OA の静脈内注射を受けたすべての感作ラットは 15~30 分以内にアナフ

イラキシーショックで死亡した。対照的に、
OA-PEG₆ または OA-PEG₂₀ のどちらも、感作動物
への投与によつて何ら観察可能な不快症状を誘
発させえなかつた。前記(9)に報告されたと一致
するこれらの知見は更に、PEG 変性抗原がイン
ビボで能動的に感作した動物の IgE 抗体と相互
反応しないということ、そして従つてアナフィ
ラキシー反応を誘発させえないということを明
瞭に示すものである。

表 I 遊離 PEG のレアギン抗体反応抑制不能

群	処 置		PCA 力価					
			一次免疫			二次免疫		
	0 日	28 日	日	抗DNP	抗OA	日	抗DNP	抗OA
対照*	DNP-OA	DNP-OA	14	3470	2090	35	930	1620
						42	1620	2470
試験A**	PEG ₆ ブラ スDNP-OA	DNP-OA	14	3470	1600	35	1400	1400
						42	1700	2690
試験B**	PEG ₂₀ ブラ スDNP-OA	DNP-OA	14	2620	1410	35	980	1660
						42	1280	1620

表 II OA-PEG 結合体の免疫抑制の特異性

群	処 理		PCA 力 価							
			一 次 免 疫				二 次 免 疫			
	0 日	28 日	日	抗 DNP	抗 OA	抗 Asc	日	抗 DNP	抗 OA	抗 Asc
対 照 A*	DNP-OA	DNP-OA	14	1,000	1,000	N. T.	35	3,310	3,500	N. T.
							42	1,280	3,020	N. T.
試 験 A**	OA-PEG ₆ ブラ スDNP-OA	DNP-OA	14	<10	<10	N. T.	35	80	480	N. T.
							42	480	860	N. T.
対 照 B*	DNP-Asc	DNP-Asc	14	890	N. T.	200	35	1,000	N. T.	1,500
							42	640	N. T.	840
試 験 B***	OA-PEG ₆ ブラ スDNP-Asc	DNP-Asc	14	600	N. T.	180	35	1,650	N. T.	1,700
							42	780	N. T.	640

* 対照群 A および B のマウスは第 0 日および第 28 日にそれぞれ、感
作薬量の DNP-OA または AL(OH)₃ 中 10 μg の DNP-Asc が与えられた。

** 試験群 A のマウスは第 0 日に DNP-OA の感作薬量の投与の 4 時間前に
800 μg の OA-PEG₆ の静脈内注射が与えられ、そして第 28 日に同一
薬量の DNP-OA がチャレンジされた。

*** 試験群 B のマウスは第 0 日に AL(OH)₃ 中 10 μg の DNP-Asc で感作さ
せる 4 時間前に 800 μg の OA-PEG₆ の静脈内注射が与えられ、そして
第 28 日に同一薬量の DNP-Asc がチャレンジされた。

N.T. = 試験せず

表Ⅲ OA-PEG₆ による継続レアギン抗体反応の阻止

群	処 理	PCA 力 価							
		一 次 免 疫			二 次 免 疫				
		日	化 合 物	日	抗 DNP	抗 OA	日	抗 DNP	抗 OA
対照	0	DNP-OA		36	450	680			
	40	DNP-OA					47	5,750	7,500
							54	3,310	6,460
	68	DNP-OA					75	5,750	12,750
							82	3,570	6,800
試験	0	DNP-OA		36	450	680			
	37	OA-PEG							
	38	OA-PEG							
	39	OA-PEG							
	40	DNP-OA					47	230	1,600
							54	1,400	2,050
	68	DNP-OA					75	800	2,560
							82	760	1,800

表Ⅳ

OA-PEG₂₀ による継続レアギン抗体反応の阻止

群	処 理	PCA 力 価								
		一 次 免 疫			二 次 免 疫					
		0 日	22 日	28 日	日	抗DNP	抗OA	日	抗DNP	抗OA
対 照	DNP-OA		NIL	DNP-OA	14	1,660	1,280	35	1,500	6,610
					21	850	1,660	42	5,120	5,120
					24	870	1,620			
試 験	DNP-OA		OA-PEG ₂₀	DNP-OA	14	1,660	1,280	35	400	800
			(0.8 mg)		21	850	1,660	42	700	800
					24	835	1,660			

表Ⅴ

アドプティブ細胞移植における非反応性の保持

群	ドナーマウス の処理*		PCA 力価** (細胞移植前)			PCA 力価 (細胞移植後)		
	0 日	36 日	日	抗 DNP	抗 OA	日	抗 DNP	抗 OA
対 照	DNP-OA	PBS	14	1,280	1,800	7	900	1,500
			36	850	1,850	14	1,280	1,950
			38	810	1,960			
			41	810	2,950			
試 験	DNP-OA	OA-PEG ₆ (0.2 mg)	14	1,280	1,800	7	40	320
A			36	850	1,850	14	80	370
			38	710	1,700			
			41	760	1,600			
試 験	DNP-OA	OA-PEG ₆ (0.8 mg)	14	1,280	1,800	7	40	180
B			36	850	1,850	14	60	270
			38	350	1,280			
			41	400	1,280			

* すべての X 線照射受容体には適当なドナー群からの 5×10^7 個の脾細胞の移植後 4 時間以内に感作薬量の DNP-OA が与えられた。

** 表のこの部分での PCA 力価はマウス感作後第 14 日、第 36 日、第 38 日および第 41

日目のドナーマウス中のレアギン抗体水準を意味している。

*** 表のこの部分の PCA 力価はアドプティブ移植後第 7 日および第 14 日に検出された受容体マウスのレアギン抗体水準を意味している。

表Ⅵ 血球凝集抗体反応に及ぼす OA-PEG 結合体の影響

群	処 理*	LOG ₂ HA 力価**					
		一 次 免 疫			二 次 免 疫		
		日	抗 DNP	抗 OA	日	抗 DNP	抗 OA
対 照	DNP-OA	7	4	2	35	8	9
		14	6	5	42	8	10
試 験 A	OA-PEG ₆ (0.2 mg) プラス DNP-OA	7	4	2	35	7	9
		14	4	6	42	7	10
試 験 B	OA-PEG ₆ (1.0 mg) プラス DNP-OA	7	3	2	35	5	8
		14	3	4	42	5	8
試 験 C	OA-PEG ₂₀ (0.2 mg) プラス DNP-OA	7	5	1	35	8	9
		14	6	5	42	7	11
試 験 D	OA-PEG ₂₀ (1.0 mg) プラス DNP-OA	7	4	2	35	5	9
		14	3	2	42	5	9

* 第 0 日に記載の処理を与えた他に、すべてのマウスは第 28 日に第 2 の DNP-OA 感作注射が与えられた。

** HA力価はマウスの第一感作後第7、14、35

および42日目に測定された。

表Ⅶ RAG-PEG₆による免疫抑制の特異性

群	処 理*			第41日の抗 RAG PCA 力価
	0日	33日	34日	
対照Ⅰ	RAG	PBS	RAG	480
対照Ⅱ	RAG	RAG (500 μg)	RAG	560
対照Ⅲ	RAG	OA-PEG ₆ (500 μg)	RAG	500
試験	RAG	RAG-PEG ₆ (500 μg)	RAG	60

* すべての4群の動物は第0日および第34日、AL(OH)₃中の日にRAGの二つの感作量が与えられそして

第33日には各群には第3欄に記載の化合物(AL(OH)₃なしに)が静脈内に与えられた。そして第41日目に

抗RAGレアギン抗体が供試された。

化合物の静脈内注射でチャレンジした。

** PEG₆とPEG₂₀との未結合調製物をエバンスブルー染料の存在下にOAと共に同一溶液中で注射した。

表Ⅷ RAG-PEG結合体のPCA反応誘発不能*

実験番号	チャレンジに使用された化合物	化合物 量(μg)	PCA 力価
1	RAG	1	740
2	RAG-PEG ₂₀	1	<10
3	RAG-PEG ₂₀ +20分後のRAG	1 1	<10 740

* 雑交配ラットをマウス抗RAGレアギン血清で感作させ、そしてこれらを24時間後にエバンスブルー染料の存在下に第2欄に示した化合物を静脈内注射することによってチャレンジした。

例 3

混合無水物を使用して犬アルブミン(DA)と異

表 Ⅷ

OA-PEG結合体のPCA反応誘発不能性*

実験番号	チャレンジに使用する化合物	注射量(μg)	PCA 力価
1	OA	1	1,400
2	OA + PEG ₆ **	1 3	1,500
3	OA + PEG ₆ **	1 3	1,500
4	OA-PEG ₆	1	<10
5	OA-PEG ₆	10	60
6	OA-PEG ₂₀	1	<10
7	OA-PEG ₂₀	6	<10
8	OA-PEG ₆ +20分後OA	1 1	<10 960
9	OA-PEG ₂₀ +20分後OA	1 1	<10 900

* 雑交配ラットをマウス抗OAレアギン血清で皮内感作させ、そして24時間後にPBS中のエバンスブルー染料と共に第2欄に示した化

つた分子量のモノメトキシポリエチレングリコール(mPEG-OH)との結合体を製造した。この方法は3段階を包含している。

a) mPEG-O-C(=O)CH₂CH₂COOHの製造

20 ml 乾燥ピリジン中のmPEG-OH (0.8ミリモル)の溶液に、800 mg (8ミリモル)のクロロホルム酸無水物を加えそして合した溶液を室温で一晩攪拌した。溶液を真空下に蒸発により除去した。残渣を15 mlのベンゼンに溶解させ、そしてその生成物を20 mlの予冷したヘキサンの添加により沈澱させた。次いで沈澱を濾過により集め、そしてこれを蒸留水中に溶解した。水性溶液をカンテイボア(登録商標)ガンマ透析バック(m.w. カットオフ4,000、クオンティメトリックス社製)中で蒸留水に対して透析しそしてその生成物を最後に凍結乾燥した。

b) mPEG-O-C(=O)CH₂CH₂C(=O)OCH₂CH(CH₃)₂の製造

mPEG-O-C(=O)CH₂CH₂COOH(0.4 ミリモル)を10 ml のクロロホルムに溶解させた。その温度を氷浴を使用して0℃を保ち、そしてこの溶液に乾燥窒素ガスの泡を通した。トリエチルアミン(0.4 ミリモル)をこの溶液に加え、そしてその後でイソブチルクロロホルメート(0.4 ミリモル)を滴加した。反応溶液を30分間0℃に保ちそして次いで室温で真空下に蒸発させた。残渣を数回石油エーテルで洗いそして白色結晶性生成物を得た。

c) 犬アルブミンと mPEG-O-C(=O)CH₂CH₂C(=O)OCH₂CH(CH₃)₂ との結合

犬アルブミン(200 mg)を30 ml の硼酸バッファ(pH 9.6)に溶解させた。温度を氷浴を使用して0℃に保つた。mPEG-O-C(=O)CH₂CH₂C(=O)OCH₂CH(CH₃)₂ (量に関しては表X参照)を固体状態で少量ずつ加えた。この反応溶液を0℃で3時間攪拌し、

ブミン中のmPEG置換基の量を定量することによって決定された。遊離アミノ基の数は、オースタルアルデヒド法(Biochim.Biophys.Acta 第434巻(1976)第209頁参照)を使用して測定された。表Xには結合度はDA1分子当りのPEG分子数として与えられている。

そのようにして製造された結合体のアレルギー性、免疫寛容性および抗原性を試験しそしてその結果は次の表Ⅷに要約されている。

免疫寛容性は、前記の方法に従って判定されそして免疫寛容の程度はDAの3感作乗量のみを与えられた対照動物の力価に関しての第3感作後のIgE力価の平均低下を表わしている。6~100のファクターだけの減少は、良好な免疫寛容度を意味している。

アレルギー性は、二つの方法すなわちRASTベースの方法およびPCA中和試験により測定され

そして次いで16時間冷蔵庫に保存した。次いでこの反応溶液をセファロース(登録商標)6Bカラムに通した。蛋白を含有しそしてmPEG誘導体を含まない分画を集め、そして凍結乾燥した。遊離mPEGは薄層クロマトグラフィーで検出された。

表 X

物質 番号	mPEG-O-C(=O)CH ₂ CH ₂ COOH 分子重	犬アルブミ ン(DA) 使用量(mg)	犬アルブミ ン(DA) 量(mg)	結 合 体	
				遊離アミ ノ基	結合度 PEG/DA
3a	2000	200	200	50	13
3b	2000	280	200	42	21
3c	2000	1,000	200	23	36
3d	3,500	500	200	54	9
3e	3,500	870	200	45	15
3f	3,500	1,750	200	29	33
3g	3,500	2,500	200	23	35

結合度は、nmr 技術によつて変換された犬アル

た。

RASTベースの方法[Int.WHO IABS Symp. on Standardization and Control of Allergens Administered to Man 1974, Develop.Biol. Standard. 第29巻第151~165頁(1975年)参照]においては、変性アレルゲンをアレルゲン特異性IgE含有血清と反応させる。過剰のIgEは未変性アレルゲンと反応し、共有結合的に紙ディスクにカップリングする。IgEに対する放射性ラベル抗体を加えてコンプレックスを生成させる。このコンプレックスの放射能をガンマカウンターで測定する。カウント数は抽出物との反応後の血清中のIgEの過剰量と直接比例している(前記参照文献参照)。変性アレルゲンのアレルゲン活性は、天然犬アルブミンのもの(100%)のパーセント値として表わされる。

変性アレルゲンの抗原性は、逆単一放射状免疫拡散により測定される。未変性アレルゲンに対する高力価血清を兔で生成させる。特異的沈澱生成物を、シャーレ中のアガロース中に包含させたアレルゲンの種々の濃度で比較した。相対活性は、明白な沈澱を生成させる変性アレルゲンの最低濃度からそして標準として未変性アレルゲンの最低沈澱生成濃度を使用して計算された。犬アルブミン抗原性を100%活性とした。

物質 番号	アレルゲン性		DAの抗 原性%	免疫寛 容性
	ラストDA% 20	PGAの中和%		
3a	64	80	100	30
3b	21	30	50	20
3c	<3	0	<6	2
3d	77	90	50	30
3e	<10	60	25	30
3f	<5	0	<6	20
3g	<2	0	<6	2
DA	100	100	100	50

4. 図面の簡単な説明

第1図および第2図は本発明の手段により得られる試験結果のダイヤグラムである。

特許出願人 フアーマシア・アクチエボラーク

代理人 弁理士 山下 白

